


VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

(Kapitel II des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts C 7646/RN	WEITERES VORGEHEN siehe Formblatt PCT/PEA/416	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP2005/003063	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22.03.2005	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22.03.2004
Internationale Patentklassifikation (IPC) oder nationale Klassifikation und IPC INV. C12N9/22		
Anmelder STRATHMANN BIOTEC GMBH & CO. KG et al.		
<p>1. Bei diesem Bericht handelt es sich um den internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, der von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde nach Artikel 35 erstellt wurde und dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt wird.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p>3. Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; diese umfassen</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> (an den Anmelder und das Internationale Büro gesandt) insgesamt 1-4 Blätter; dabei handelt es sich um</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Blätter mit der Beschreibung, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit Berichtigungen, denen die Behörde zugestimmt hat (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften).</p> <p><input type="checkbox"/> Blätter, die frühere Blätter ersetzen, die aber aus den in Feld Nr. 1, Punkt 4 und im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde eine Änderung enthalten, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (nur an das Internationale Büro gesandt) insgesamt (bitte Art und Anzahl der/des elektronischen Datenträger(s) angeben), der/die ein Sequenzprotokoll und/oder die dazugehörigen Tabellen enthält/enthalten, nur in elektronischer Form, wie im Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll angegeben (siehe Abschnitt 802 der Verwaltungsvorschriften).</p>		
<p>4. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. I Grundlage des Berichts</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. II Priorität</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags 13.12.2005	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.06.2006	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Bassias, I Tel. +49 89 2399-8106	



Feld Nr. I Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Sprache** beruht der Bescheid auf

- ☒ der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde.
- ☐ einer Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für folgenden Zweck eingereicht worden ist:
- ☐ internationale Recherche (nach Regeln 12.3 a) und 23.1 b))
 - ☐ Veröffentlichung der internationalen Anmeldung (nach Regel 12.4 a))
 - ☐ internationale vorläufige Prüfung (nach Regeln 55.2 a) und/oder 55.3 a))

2. Hinsichtlich der **Bestandteile*** der internationalen Anmeldung beruht der Bericht auf *(Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt):*

Beschreibung, Seiten

1-28 in der ursprünglich eingereichten Fassung

das Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten

1-3 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-26 eingegangen am 17.01.2006 mit Schreiben vom 17.01.2006

Zeichnungen, Blätter

1/3-3/3 in der ursprünglich eingereichten Fassung

☒ einem Sequenzprotokoll und/oder etwaigen dazugehörigen Tabellen - siehe Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll

3. ☐ Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung: Seite
- ☐ Ansprüche: Nr.
- ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
- ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
- ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

4. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der diesem Bericht beigelegten und nachstehend aufgelisteten Änderungen erstellt worden, da diese aus den im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

- ☐ Beschreibung: Seite
- ☐ Ansprüche: Nr.
- ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
- ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
- ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

* Wenn Punkt 4 zutrifft, können einige oder alle dieser Blätter mit der Bemerkung "ersetzt" versehen werden.

Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35 (2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-26
	Nein: Ansprüche -
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ja: Ansprüche -
	Nein: Ansprüche 1-26
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ja: Ansprüche: 1-26
	Nein: Ansprüche: -

2. Unterlagen und Erklärungen (Regel 70.7):

siehe Beiblatt

Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll

Fortsetzung von Feld Nr. 1, Punkt 2:

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist der Bericht auf folgender Grundlage erstellt worden:
 - a. Art des Materials
 - ☒ Sequenzprotokoll
 - ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
 - b. Form des Materials
 - ☒ in Papierform
 - ☒ in elektronischer Form
 - c. Zeitpunkt der Einreichung
 - ☒ in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
 - ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form eingereicht
 - ☐ bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche und/oder Prüfung eingereicht
 - ☐ bei der Behörde als Änderung* eingegangen am
2. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, daß die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:
 - * Wenn Feld Nr. 1, Punkt 4 zutrifft, können das Protokoll und/oder die zugehörige(n) Tabelle(n), die Teil der Grundlage des Berichts sind, mit der Bemerkung "ersetzt" versehen werden.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
BERICHT ZUR PATENTIERBARKEIT
(BEIBLATT)

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003063

Punkt V

1. Der geänderte Anspruchssatz, welcher mit dem Schreiben vom 17.01.2006 eingereicht wurde, scheint den Erfordernissen der Artikel 19(2) und 34(2)(b) PCT zu genügen.
2. Im Bescheid vom 16.08.2005 wurde das Fehlen einer erfinderischen Tätigkeit bezüglich des Gegenstandes aller Ansprüche bemängelt (Artikel 33(3) PCT). Der Anmelder hat keine Änderungen vorgenommen die diesen Einwand hinfällig machen könnten, sondern hat nur versucht, gegen diesen Einwand zu argumentieren. Seine Argumente wurden sorgfältig geprüft, jedoch konnten sie nicht derart überzeugen, um den Einwand gemäss Artikel 33(3) PCT zurückzunehmen.

Damit wird der Einwand unter Artikel 33(3) PCT vom ersten Bescheid gegen alle veränderten Ansprüche komplett aufrecht erhalten.

Zusammenfassend kann noch einmal gesagt werden, dass zwar ein Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten RNase A unter Anpassung der DNA-Sequenz an die Kodonverwendung von E. coli neu zu sein scheint, dass aber dieses Verfahren nicht erfinderisch gegenüber dem Stand der Technik erscheint (eine detailliertere Argumentation kann dem Bescheid vom 16.08.2005 entnommen werden).

D1, der nächstliegende Stand der Technik, beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von RNase A in E. coli. In diesem Dokument wird die Kodonanpassung nicht vorgenommen. Der Prozess der Kodonanpassung und die dadurch verbundene verbesserte Expressionsrate des zu exprimierenden Moleküls kann jedoch den Dokumenten D2 und/oder D3 entnommen werden. D2 beschreibt sogar die Kodonanpassung zur Expression von Angiogenin, einem zur bovinen, pankreatischen RNase A homologen Proteins. Die Lehre aus D1 kombiniert mit D2 oder D3 würde einen Fachmann dazu veranlassen, die Kodonanpassung der DNA-Sequenz für die Expression der RNase A in E. coli vorzunehmen.

Die Argumente des Anmelders, dass durch das beanspruchte Verfahren eine überraschend hohe Expressionsrate erzielt wurde, sind nicht experimentell belegt. Daten, die eine signifikante Steigerung der Expressionsrate der RNase A in E. coli belegen, fehlen. Gemäss Anspruch 19 soll das Verfahren eine Ausbeute von **mehr als 100 mg** RNase A pro Liter Kulturmedium liefern. In der Beschreibung (S.16, 2.

Absatz) wird von etwas 300 mg/l Kulturmedium als am meisten bevorzugte Ausbeute gesprochen.

Im Antwortschreiben vom 17.01.2006 wird aber plötzlich von einer Produktausbeute von ca. 500-600mg/l (im Gegensatz zu einer Ausbeute von 45-50 mg/l in D1) berichtet. Diese Behauptung kann nicht nachvollzogen werden, da sie weder durch Experimente belegt ist, noch mit den Angaben aus der Beschreibung vereinbar ist (hätte man eine derart hohe Ausbeute erzielt, so würde man davon ausgehen, dass dies in der Beschreibung auch protokolliert wird).

Desweiteren ist anzumerken, dass aus der Beschreibung nicht klar wird, welche Ausbeute tatsächlich erzielt wird. Gemäss den Beispielen wird nur berichtet, dass nach der Ionenaustauschchromatographie die RNase A-Lösung auf eine Endkonzentration von 100 mg/ml eingestellt wird.

Damit kann die Behauptung, dass mit dem beanspruchten Verfahren eine, im Vergleich zum Stand der Technik, überraschend hohe Ausbeute der RNase A, erzielt werden kann, nicht nachvollzogen werden und daher wird der Einwand nach Artikel 33(3) PCT aufrecht erhalten.

3. Die Verwendung der RNase A gemäss Anspruch 26 ist nahe liegend (Artikel 33(3) PCT), da die RNase A, herstellt nach dem Verfahren der vorhergehenden Ansprüche, sich nicht von anderen RNase A Molekülen unterscheidet (da die Aminosäuresequenz nicht verändert wird) und die Verwendung der RNase A zur Reinigung von DNA und Proteinen eine gängige Anwendung dieses Enzyms darstellt, die jedem Fachbuch für molekularbiologisch-technische Methoden entnommen werden kann.

10/593663

IAP9 Rec'd PCT/PTO 20 SEP 2006

PCT/EP2005/003063

17. Januar 2006

WO 2005/095595

STRATHMANN BIOTEC GMBH & CO. KG

Neue Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von rekombinanter RNase A in *E. coli*,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine RNase A bovinen Ursprungs kodiert und die an die Kodonverwendung in *E. coli* angepasst wurde.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz an die Kodonverwendung in *E. coli* K12 angepasst ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die DNA-Sequenz an das am häufigsten in *E. coli* verwendete Kodon angepasst ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die DNA-Sequenz der in SEQ ID. No. 1 angegebenen DNA-Sequenz oder einer zu der in SEQ ID. No. 1 angegebenen DNA-Sequenz zu mindestens 90 % identischen Sequenz entspricht.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die DNA-Sequenz unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit einzelner Kodons angepasst ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 5, wobei die DNA-Sequenz der in SEQ ID. No. 2 angegebenen DNA-Sequenz oder einer zu der in SEQ ID. No. 2 angegebenen DNA-Sequenz zu mindestens 90 % identischen Sequenz entspricht.

RN:GH:uh

- 2 -

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die RNase A in Fusion mit einem Signalpeptid exprimiert wird, das den Transport in den periplasmatischen Raum steuert.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei es sich bei dem Signalpeptid um das Signalpeptid der alkalischen Phosphatase (phoA) handelt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Expression der RNase A unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei es sich bei dem Promotor um einen hitze-induzierbaren Promotor handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Induktion der Genexpression am Ende der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die Induktion der Genexpression für einen Zeitraum von 14 bis 20 Stunden erfolgt.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die RNase A Inclusion Bodies bildet.
14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verfahren weiter umfasst die Gewinnung der RNase A aus den *E. coli*-Zellen bzw. dem Kulturmedium, ggf. unter Solubilisierung und Rückfaltung der RNase A.

- 3 -

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei zur Solubilisierung Guanidin-HCl als Denaturierungsmittel verwendet wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, wobei zur Rückfaltung reduziertes und oxidiertes Glutathion verwendet wird.
17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verfahren weiter umfasst eine chromatographische Aufreinigung der RNase A.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt wird.
19. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Ausbeute an RNase A mehr als 100 mg RNase A pro Liter Kulturmedium beträgt.
20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Ausbeute an RNase A mehr als 3 mg RNase A pro Gramm Biofeuchtmasse beträgt.
21. *E. coli*-Zellkultur, enthaltend mindestens 0,2 g RNase A pro Liter Kulturmedium.
22. Nukleinsäuremolekül, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1.
23. Nukleinsäuremolekül, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2.

- 4 -

24. Nukleinsäuremolekül, umfassend die folgenden Bestandteile in 5'-3'-Reihenfolge:

- einen in *E. coli* aktiven Promotor,
- ggf. eine für ein Signalpeptid im Sinne von Anspruch 7 oder 8 kodierende Sequenz,
- eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder No. 2.

25. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder No. 2 zur Herstellung von rekombinanter RNase A.

26. Verwendung von nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20 hergestellter rekombinanter RNase A in der Reinigung von DNA und Proteinen.